

**Auftrennung von Isoenzymen der sauren
alpha-Glucosidase in fötalen Organen
und Fruchtwasserzellen mittels
DEAE-Cellulose Säulenchromatographie**

Michael Drefers

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0044

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr.von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

Auftrennung von Isoenzymen der sauren
alpha-Glucosidase in fötalen Organen
und Fruchtwasserzellen mittels
DEAE-Cellulose Säulenchromatographie

Inaugural -- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Michael Drefers
aus Schwerin
1978

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schaub

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1979



Gewidmet

meinen Eltern, die mir mein
Studium ermöglicht haben

Inhaltsangabe

Einleitung	s. 1
Aufgabenstellung	S. 4
Material	S. 5
Methoden	S. 8
Ergebnisse	S. 13
Diskussion	S. 24
Zusammenfassung	S. 29
Literaturverzeichnis	S. 30

Gliederung

1. Einleitung
2. Aufgabenstellung
3. Material und Methoden
 - 3.1. Chemikalien
 - 3.2. Geräte
 - 3.3. Proben
 - 3.4. DEAE-Cellulose
 - 3.4.1. als Anionenaustauscher
 - 3.4.2. Aufbereitung zur Chlorid-Form pH 7
 - 3.5. Auftrennung der Proben in Fraktionen
 - 3.5.1. Anionenaustauschersäule
 - 3.5.2. Gradientenmischer
 - 3.5.3. Fraktionensammler
 - 3.5.4. Schlauchpumpe
 - 3.6. Enzymtest
 - 3.6.1. Methodenkritik
 - 3.6.2. Fluoreszenztest
 - 3.6.3. Ansatz des Fluoreszenztests
 - 3.6.4. Messung im Fluoreszenzmikroskop
 - 3.6.5. Berechnung der Enzymaktivität
 - 3.7. Proteinbestimmung
 - 3.8. Leukozytenpräparation
4. Ergebnisse
 - 4.1. Einfluß von NaCl und KCl
 - 4.2. DEAE-Cellulose Säulenchromatographie
 - 4.2.1. Fibroblasten
 - 4.2.2. Fruchtwasserzellen
 - 4.2.3. Leukozyten
 - 4.2.4. Leber
 - 4.2.5. Gehirn, Herzmuskel und Skelettmuskel
 - 4.2.6. Niere
 - 4.2.7. Fruchtwasser
 - 4.2.8. Plasma
 - 4.2.9. Urin
5. Diskussion
6. Zusammenfassung

1. Einleitung

Als erster beschrieb 1963 Hers (1), daß bei der Glykogenspeicherkrankheit Typ II (Pompe'sche Krankheit) in der Leber die saure alpha-1-4-Glucosidase mit einem pH-Optimum bei 4 fehlt. Dieses Enzym hydrolysiert Maltose, unverzweigte Oligosaccharide sowie die alpha-1-4-Verbindungen von Glykogen (2). Lejeune und Mitarbeiter (3) zeigten an Rattenleber, daß das Enzym in Lysosomen lokalisiert ist. Bislang wurde der Enzymdefekt bei klassischer Pompe'scher Krankheit in mehreren Organen nachgewiesen: Gehirn (4), Pankreas (4), Leukozyten (5,6,7), gezüchteten Hautfibroblasten (5,8), Herz- und Skelettmuskel (9).

Die ausgeprägte Glykogenanhäufung in den meisten Organen führt bereits im ersten Lebensjahr zum Tode. Die klinischen Symptome sind Herzvergrößerung mit Insuffizienz, Hepatosplenomegalie sowie Muskelschwäche. Neben der klassischen ("kindlichen") Form der Pompe'schen Krankheit existiert jedoch auch noch eine Variante ("Erwachsenenform"). Patienten mit dieser Variante leben länger, die Muskelschwäche entwickelt sich später und in Leber (10), Leukozyten (10,11) und gezüchteten Hautfibroblasten (12) konnte teilweise Aktivität von saurer alpha-Glucosidase nachgewiesen werden. Die Vermutung, daß für diese unterschiedliche Ausprägung unterschiedliche genetische Mutationen verantwortlich sein könnten, wurde von Reuser und Mitarbeitern (12) nicht bestätigt.

Für die Existenz von alpha-Glucosidase-Isoenzymen sprechen jedoch folgende Punkte:

1. In vielen Organen wurde eine alpha-Glucosidase mit neutralem pH-Optimum gefunden. Sie ist jedoch nicht lysosomaler Herkunft (3) und ihre Aktivität unterscheidet sich von der sauren Form in der Beeinflussbarkeit durch Hitzeinaktivierung (13), Zusatz von Kaliumionen (14) und Turanosehemmung (3). Vor allem jedoch ist sie auch bei Pompe'scher Krankheit in normaler Aktivität vorhanden, was bei der Pompe-Diagnosestellung eine gewisse Vorsicht verlangt.

Eine geringe Aktivität der neutralen Form bei saurem pH muß besonders bei Verwendung des empfindlichen Fluoreszenztestes mit Methylumbelliferylglucosid als Substrat beachtet werden (15).

2. Auch die alpha-Glucosidase in der Niere ist bei Pompe'scher Krankheit in fast normaler Aktivität vorhanden (4,15,16). Dieses Nierenenzym hat über einen weiten pH-Bereich von 4 bis 9 Aktivität und unterscheidet sich vom Leberenzym auch elektrophoretisch (17) und immunologisch (18).

In Urin fanden Salafsky und Nadler (19) eine ähnlich breite pH-Aktivitätskurve mit leichter Rechtsverschiebung bei Pompe-Patienten.

Auch zellfreies Fruchtwasser zeigt stets Aktivität mit einem pH-Optimum um 5,6 (13).

3. Untersuchungen über das Verhalten der alpha-Glucosidasen in der Elektrophorese stammen von Dreyfus und Alexandre (17), Salafsky und Nadler (15,19), Koster und Mitarbeitern (11,20), Lenard und Mitarbeitern (21) sowie Swallow und Mitarbeitern (22). Sie verwandten verschiedene Methoden und fanden häufig nur eine, zum Teil aber auch zwei (11,21) Banden des sauren Enzyms.

4. Zusätzlich zeigten Swallow und Mitarbeiter (22) mit Affinitätselektrophorese eine variable Aufspaltung der sauren alpha-Glucosidase: In einem von 16 Fällen fand sich eine zweite Bande in verschiedenen Organen.

Zum einen war die Auftrennung jedoch nur durch diese Methode (Stärkezusatz im Gel) möglich, zum anderen ließ sich kein Krankheitswert zuordnen, auch nicht im Falle einer (von 1691 untersuchten) Plazenta, welche die zweite, weiter anodisch wandernde Bande als einzige zeigte.

5. Mittels Sephadex G-100 Gelfiltration zeigten Soyama und Mitarbeiter (23) in verschiedenen Organen zwei alpha-Glucosidase-Peaks auf, ebenso wie Franzini und Bonini (24) im Urin. Der zweite Peak zeigte nur bei saurem pH Aktivität, der erste Peak überwiegend bei neutralem pH, allerdings mit deutlich meßbarer Aktivität auch bei saurem pH.

Die Frage nach verschiedenen alpha-Glucosidase-Formen ist von praktischer Bedeutung. Da eine wirksame Therapie der Pompe'schen Krankheit bis heute nicht bekannt ist (25), stellt die pränatale Diagnostik mit anschließender Interruptio zur Zeit der einzigen Ausweg dar. Der Nachweis des Enzymdefekts in gezüchteten Fruchtwasserzellen ist dank empfindlicher Methoden bereits in einer Menge von wenigen hundert Zellen möglich (26). Eine weitere Möglichkeit neben der pränatalen Diagnostik bietet die Erfassung von heterozygoten Erbträgern der Pompe'schen Krankheit in Lymphozyten und gezüchteten Hautfibroblasten (5,11,27,28). Leider überschneiden sich jedoch die Bereiche, in denen die Enzymaktivitäten von Heterozygoten einerseits und von Gesunden andererseits liegen. Die mögliche Existenz von alpha-Glucosidase-Isoenzymen ist hier ebenso ein Unsicherheitsfaktor wie bei der pränatalen Diagnostik.

2. Aufgabenstellung

Um die Frage nach verschiedenen alpha-Glucosidase-Formen zu klären,versuchten wir mit einer weiteren Methode,nämlich DEAE-Säulenchromatographie,eine Auftrennung.Die Probe, die das Enzym enthält,wird auf eine mit DEAE gefüllte Säule gegeben und aus der anionischen Bindung durch einen Puffer mit steigender Ionenkonzentration fraktioniert ausgewaschen.

Diese Auftrennung verlangt normalerweise größere Probemengen;es sollte jedoch versucht werden,auch Zellen zu untersuchen,die zwar nur in kleiner Menge vorliegen,die jedoch für die pränatale Diagnostik und für die Heterozygotenerfassung entscheidende Bedeutung haben: gezüchtete Fruchtwasserzellen und Hautfibroblasten, eventuell auch Leukozyten aus dem Blut von Erwachsenen und von Föten.

Dafür war eine spezielle Dimensionierung des Versuchsaufbaus nötig:

Eine besonders kleine Säule,
ein selbstgefertigter Gradientenmischer für kleine Puffermengen,

Sammlung der Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen,
ein sehr empfindlicher Fluoreszenztest mit alpha-1-4-Methylumbelliferylglucosid als Substrat
sowie die Messung in Kapillaren mit Hilfe eines empfindlichen Fluoreszenzmikroskops.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

4-Methyl-Umbelliferyl- α -D-Glucosid

4-Methyl-Umbelliferon

beide von Sigma Chemical Company, Saint Louis
oder von Koch-Light Laboratories, Colnbrook, England

Diäthylaminoäthyl-Cellulose: Serva DEAE 23 SS
von Serva Feinbiochemika, Heidelberg

3.2. Geräte

Sonifier B 10 Branson mit Mikrospritze

Pottor-Elvehjem Glashomogenisator

Gradientenmischer, Eigenfertigung, max. 10 ml Inhalt

Schlauch-Rotationspumpe Desaga PLG (Mikro-Peristaltic)

Fraktionensammler Gilson Microcol TDC 80 mit

photoelektrischem Tropfenzähler

Fluoreszenzmikroskop Leitz MPV 2

Drummond-Mikrokapillaren, 50 μ l

3.3. Proben

kultivierte Hautfibroblasten

kultivierte Fruchtwasserzellen

Fruchtwasser als Überstand nach Zentrifugation

Plasma von Föten und von Erwachsenen

Leukozyten von Föten und von Erwachsenen

Leber von Föten und von Erwachsenen

Niere von Föten und von Erwachsenen

Gehirn von Föten

Muskel von Föten

Urin von Kindern und von Erwachsenen

Fibroblasten und Fruchtwasserzellen waren in HAM's F 10 Medium mit Zusatz von 20 Prozent fötalem Kalbsserum gezüchtet und wurden mit einem auf Draht aufgezogenen Silikonschlauch von den Glas-oderPlastikflaschen abgeschabt, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und nach Zentrifugation (2000 UpM) noch dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Fruchtwasser wurde ebenso wie Urin 10 Minuten lang bei 2000 UpM und bei 10°C zentrifugiert.

Sämtliche Föten entstammten legalen Schwangerschaftsabbrüchen mit Prostaglandin und wurden frisch seziiert. Die fötalen Organe sowie das Biopsiematerial von Erwachsenen wurde im Elvehjem-Pottor zusammen mit fünf Teilen 0,02 prozentigem Mercaptoäthanol mittels Teflon-Pistel homogenisiert.

Frische Proben wurden entweder mit Ultraschall behandelt und sofort verwandt oder bei -20°C unterschiedlich lange aufbewahrt und zur Bearbeitung langsam auf Zimmertemperatur erwärmt.

3.4. DEAE- Cellulose

3.4.1. als Anionenaustauscher

Das Prinzip der Anionenaustauschchromatographie beruht auf der Fähigkeit von DEAE-Cellulose, Anionen reversibel zu binden. Die bei pH 7 anionisch vorliegende Probe wird zunächst im Austausch gegen Chloridionen festgehalten. Eine Anionen enthaltende Waschflüssigkeit kann in hoher Konzentration jedoch die Probe wieder freisetzen. Die Konzentration muß umso höher sein, je fester die Bindung der Probe oder ihres jeweiligen Anteils an DEAE- Cellulose ist.

3.4.2. Aufbereitung zur Chlorid-Form pH 7

DEAE-Cellulose als trockenes Pulver wird in reichlich destilliertem Wasser aufgelöst. Nach Sedimentation wird dekantiert und das Sediment noch dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Dann wird 1-normale Natronlauge dazugegeben und eine Stunde lang gerührt.

Nach Sedimentation wird das Sediment wiederum dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, bis pH 7 erreicht ist. Um die DEAE-Cellulose nun in die Chloridform zu bringen wird 1-normale Salzsäure zugegeben, eine Stunde lang gerührt und nach Sedimentation noch dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Bei Bedarf wird noch mit 1-normaler Natronlauge auf pH 7 titriert und nochmals gewaschen.

3.5. Auftrennung der Proben in Fraktionen

3.5.1. Anionenaustauschersäule

Die kleinen Säulen waren aus den Spitzen von 2 ml-Meßpipetten gefertigt, hatten einen Innendurchmesser von 0,36 cm und eine Höhe von 5 cm, entsprechend einem Fassungsvermögen von 600 µl. In die Säulenspitzen wurde zunächst etwas Glaswolle gestopft, danach wurden 300 µl aufbereitete DEAE-Cellulose eingefüllt. Darauf wurde eine Probenmenge aufgetragen, die mindestens 500 Zellen entsprach. Als erste Fraktion wurde direkt die durchtropfende Flüssigkeit gesammelt.

3.5.2. Gradientenmischer

Der selbstgefertigte Gradientenmischer bestand aus einem 10 ml fassenden Glasgefäß mit einem Teflon-Rührkern, der von einem Magnetrührer bewegt wurde. In dieses Gefäß wurden 4 ml 0,01 molare Kochsalzlösung gefüllt. Durch ein Schlauchsystem wurden nun luftdicht folgende Verbindungen hergestellt: Von einem Vorratsbehälter mit 0,6 molarer Kochsalzlösung zum Zulaufstutzen oben am Gradientenmischer; von dessen Abflußstutzen unten über eine Mikro-Rotationsschlauchpumpe auf die Säule (Gummidichtung); von der Auslaufspitze der Säule weiter zum Fraktionensammler.

3.5.3. Fraktionensammler

Der Fraktionensammler mit photoelektrischem Tropfenzähler sammelte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 22 verschiedene Fraktionen mit je 200 µl (9 Tropfen).

3.5.4. Schlauchpumpe

Die konstante Geschwindigkeit der Mikro-Rotationsschlauchpumpe wurde auf eine Flußgeschwindigkeit von 3 ml pro Stunde eingestellt, so daß die Auftrennung in 90 bis 120 Minuten beendet war.

3.6. Enzymtest

3.6.1. Methodenkritik

Zur Messung der alpha-1-4-Glucosidase-Aktivität benutzte Hers (5) einen Test mit Glykogen oder mit Maltose als Substrat und bestimmte die freigesetzte Glukose. Auch radioaktiv markiertes Glykogen (im Tierversuch gewonnen) oder Maltose können als Substrat dienen. Außerdem katalysiert alpha-1-4-Glucosidase auch die Transglucolysierung von Maltose auf Glykogen; zur Messung dieser Reaktion dient wiederum radioaktiv markierte Maltose (6).

Durch die Verwendung künstlicher Substrate wurde die Enzymmessung vereinfacht: Fluharty und Mitarbeiter (14) verwandten als Substrat p-Nitrophenyl-alpha-D-Glucosid. Alpha-Glucosidase spaltet dieses Substrat mit hoher Spezifität und das freigesetzte p-Nitrophenol wird photometrisch bei 405 nm gemessen.

3.6.2. Fluoreszenztest

Wir verwandten stes den ebenso spezifischen aber wesentlich empfindlicheren Fluoreszenztest, der von Salafsky und Nadler beschrieben wurde (15). Hierbei ist 4-Methylumbilliferon ebenfalls alpha-glukosidisch an Glucopyranosid gebunden. Nach enzymatischer Spaltung fluoresziert das entstehende 4-Methylumbilliferon sehr stark im alkalischen Milieu. Die Eigenfluoreszenz des ungespaltenen Substrats sowie spontane Spaltung werden durch einen Leerwert berücksichtigt.

3.6.3. Ansatz des Fluoreszenztests

30 µl Probe a) von jeder Fraktion

b) von Probe, die vor Auftrennung mit zehn
Teilen destilliertem Wasser verdünnt wurde

c) nur destilliertes Wasser für Leerwert

50 µl Methylumbilliferyl-alpha-D-Glucopyranosid als 2,2 mM
Lösung in 0,2 M Acetatpuffer, welcher mit 0,2 M NaOH
auf pH 4,0 bzw. pH 5,0 bzw. pH 7,0 eingestellt ist.
bzw. 50 µl 0,005 mM Methylumbilliferon für Standard

80 µl Testvolumen

Inkubation bei 37°C im Wasserbad für eine bis mehrere
Stunden. Der Test wird gestoppt durch Zugabe von 100 µl
Acetatpuffer, einmolar mit pH 10,7.

3.6.4. Messung im Fluoreszenzmikroskop

An Stelle der sonst üblichen Fluorometer, bei denen in Küvetten gemessen wird, verwandten wir ein Fluoreszenzmikroskop, welches die Messung in 50 μ l Kapillaren ermöglicht. Ein Kapillarenhalter auf dem Mikroskoptisch erleichtert das Zentrieren der Kapillaren bzw. eines einstellbaren Ausschnittes im Strahlengang.

Eine Xenon-Hochdrucklampe mit regulierbarer Spannung bestrahlt diesen Ausschnitt mit Anregungslicht, dessen Wellenlänge zwischen 330 nm und 490 nm liegt. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz zwischen 500 nm und 700 nm im Photovervielfacher gemessen. Ein Dichromator trennte zusätzlich die Strahlengänge von Anregungslicht und Fluoreszenz. Zur Sicherheit wurden die Messungen in einem dunklen Raum ausgeführt; außerdem wurde jede Messung in zehn Teilmessungen innerhalb einer Sekunde unterteilt. Abbildung 1 zeigt die Fluoreszenzstandardkurven von 4-Methylumbelliferon a) mit dem Leitz-Fluoreszenzmikroskop gemessen und b) mit mit konventionellem Zeiss-Spektrofluorometer gemessen:

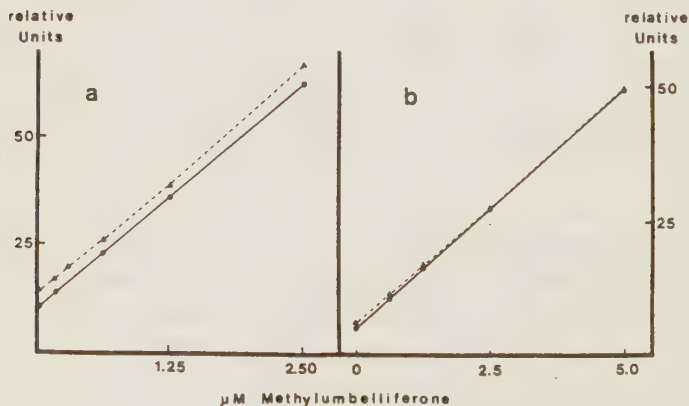


Abb. 1. Fluoreszenzstandardkurven mit zwei Instrumenten gemessen: a) Leitz-Fluoreszenzmikroskop (80 μ l Testvolumen) b) Zeiss-Spektrofluorometer (800 μ l Testvolumen)

---▲--- alpha-Glucosidase bei pH 7,0

—●— alpha-Glucosidase bei pH 4,0

3.6.5. Berechnung der Enzymaktivität

Zur Berechnung der Enzymaktivität als Nanomole freigesetztes Methylumbilliferon pro Minute und pro milligramm Protein diente die Formel:

$$\frac{\text{nmole Methylumbilliferon in 1 ml Standard} \times T \text{ der Probe}}{T \text{ des Standards} \times \text{Inkubationszeit (min)} \times \text{Proteinkonz. (mg/ml)}}$$

(T = Transmission)

Gewöhnlich wurde jedoch nur die Transmission als Parameter für die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen vergleichend gemessen, d.h.: die größte gemessene Transmission wurde als 100% gesetzt.

3.7. Proteinbestimmung

Zur Messung der Proteinkonzentration und Einsetzen des Wertes in obige Formel wurde ein Mikrotest nach Lowry (29) benutzt:

Herstellung von Kupferreagenz:

0,02 ml einer Lösung von 5,5 g CuSO_4 /100 ml H_2O
mit 0,2 ml einer Lösung von 1,35 g Seignettesalz/100 ml
0,22 ml ; davon 0,1 ml
mit 5,0 ml 2%iger Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 normaler NaOH

Ansatz: 200 μl frisches Kupferreagenz

20 μl Probe bzw. Albuminlösung (Standard)

bzw. Wasser (Leerwert)

220 μl , 10 Minuten bei Raumtemperatur

dazu 20 μl Folin-Ciocalteus-Reagenz, 1:2 verdünnt

 mit 2 %iger Natriumcarbonatlösung

240 μl , 30 Minuten im Dunklen stehen lassen

Ablesen: bei 772 nm in Mikroküvette gegen Leerwert

Berechnung: aus Standardkurve

3.8. Leukozyten-Präparation

Die Dextran-Sedimentationsmethode nach Wyss und Mitarbeitern (30) wurde in unserem Labor folgendermaßen modifiziert:

In ein Teil einer Lösung, die aus 5 g Dextran und 0,7 g Kochsalz und 50 mg Heparin auf 100 ml Wasser besteht, läßt man fünf Teile Blut hineintropfen, mischt und läßt eine Stunde lang sedimentieren. Der Überstand wird abgehoben und 15 Minuten lang bei 1500 UpM zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit etwas 0,1 prozentiger Essigsäure kurz geschüttelt. Dann wird mit 0,7 prozentiger Kochsalzlösung auf ca. 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert und das Sediment noch einmal mit 0,7 prozentiger Kochsalzlösung gewaschen.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluß von NaCl und KCl

Versuchstechnisch bedingt enthalten die aufgetrennten Fraktionen steigende Konzentrationen von NaCl. Daher wurde zunächst der Einfluß von verschiedenen Chloridsalzen auf die saure alpha-Glucosidase-Aktivität in verschiedenen fötalen Organen und in gezüchteten Zellen geprüft. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 2. Kaliumionen fördern die Enzymaktivität in den meisten Organen; auf Nieren- und Fruchtwasserenzym haben sie jedoch keinen Einfluß.

Magnesiumionen haben einen leicht hemmenden Effekt auf alpha-Glucosidase in fötaler Leber und Hirn.

Natriumionen hingegen haben auch in hohen Konzentrationen kaum einen Effekt.

Daher konnte die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen ohne weitere Verdünnung bzw. Angleichung der NaCl-Konzentrationen gemessen werden.

Abbildung 2.

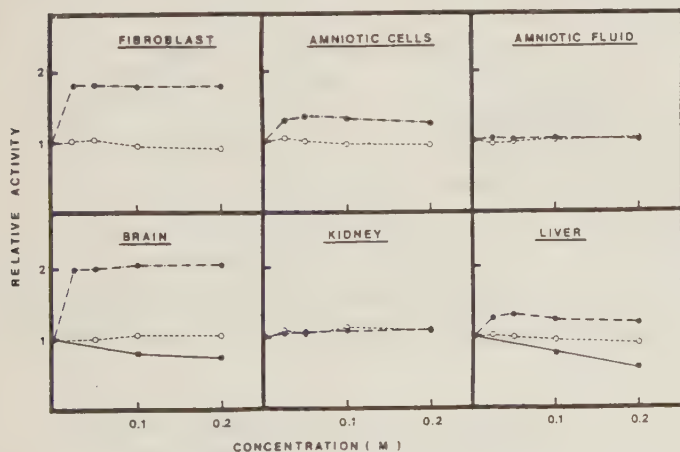


Abb.2. Einfluß von Chloridsalzen auf die Aktivität der sauren alpha-Glucosidase. ---●--- KCl; ---○--- NaCl; —■— MgCl₂. Für Niere und Fruchtwasser wurde die Aktivität bei pH 5,6 gemessen, sonst bei pH 4,0.

4.2. DEAE- Cellulose Säulenchromatographie

4.2.1. Fibroblasten

Die Abbildungen 3a-3c zeigen die Ergebnisse, die mit DEAE-Cellulose Säulenchromatographie gewonnen wurden. Es handelt sich um die alpha-Glucosidase aus kultivierten Hautfibroblasten.

Bei der Auftrennung frischer Fibroblastenextrakte wurde das neutrale Enzym in drei Fraktionen, das saure Enzym in zwei Fraktionen eluiert (Abb.3a).

Die zuerst eluierende Fraktion beider Enzyme war nicht mehr nachweisbar, wenn die Extrakte vor der Auftrennung eingefroren und bei -20°C einen Tag lang aufbewahrt wurden (Abb.3b).

Wurden die Extrakte noch einige Tage länger bei -20°C aufbewahrt, so war neutrale alpha-Glucosidase-Aktivität nur noch in Spuren in der ursprünglich mittleren Fraktion nachzuweisen (Abb.3c).

4.2.2. Fruchtwasserzellen

Das gleiche Elutionsmuster wie Fibroblasten zeigten frische kultivierte Fruchtwasserzellen. Die zuerst eluierende Fraktion des sauren und des neutralen Enzyms war ebenfalls nur bei der Auftrennung frischer Extrakte nachweisbar (Abb.4a).

Einen Unterschied zwischen Fibroblasten und Fruchtwasserzellen zeigte die Stabilität der neutralen alpha-Glucosidase. In Fruchtwasserextrakten war das neutrale Enzym noch deutlich nachweisbar, nachdem die Extrakte eine Woche lang bei -20°C aufbewahrt waren (Abb.4b).

Abbildung 3.

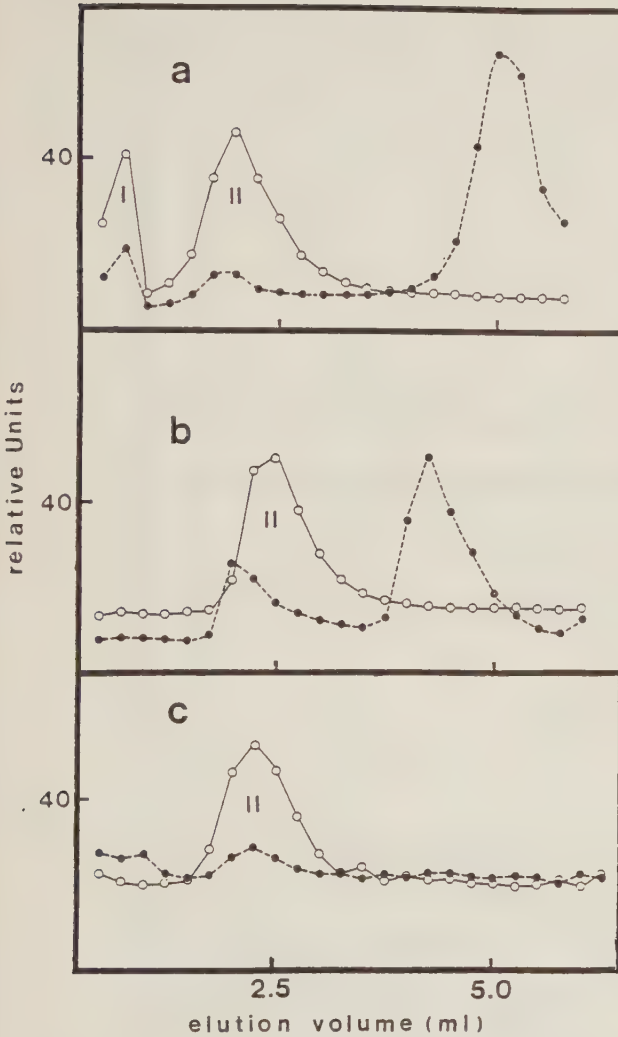


Abb.3. DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Fibroblasten
a) frische Extrakte, b) Extrakte einen Tag bei -20°C aufbewahrt, c) Extrakte drei Tagelang bei -20°C aufbewahrt.

—○— Enzymaktivität bei pH 4,0 gemessen
—●— Enzymaktivität bei pH 7,0 gemessen

Abbildung 4.

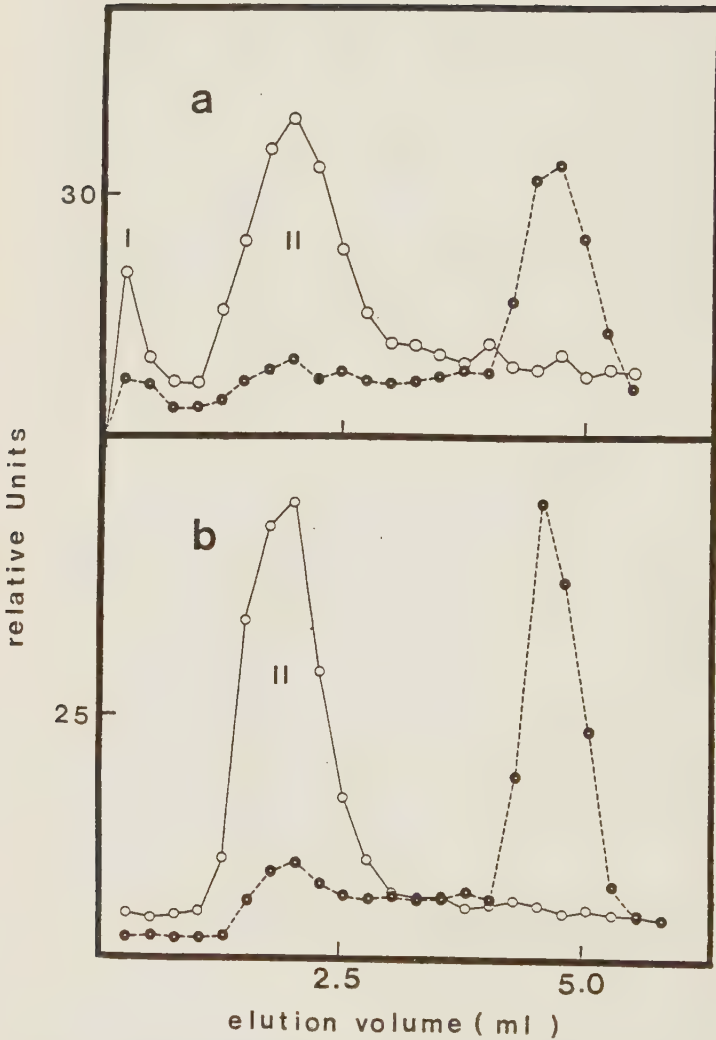


Abb.4. DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von kultivierten Fruchtwasserzellen, a) frisches Extrakt b) Extrakt, das fünf Tage bei -20°C aufbewahrt wurde
—○— Aktivität bei pH 4,0 ---●--- bei pH 7,0 gemessen

4.2.3. Leukozyten

Leukozyten wurden aus dem Blut von Erwachsenen und von Föten isoliert. Alpha-Glucosidase von Erwachsenen-Leukozyten wurde bei der Säulenchromatographie in je einem Peak des sauren und des neutralen Enzyms eluiert (Abb.5a).

Die saure alpha-Glucosidase von fötalen Leukozyten wurde ebenfalls in einem Peak eluiert. Die neutrale alpha-Glucosidase von fötalen Leukozyten dagegen zeigte ein elutionsmuster aus vielen kleinen Peaks (Abb.5.b).

Abbildung 5.

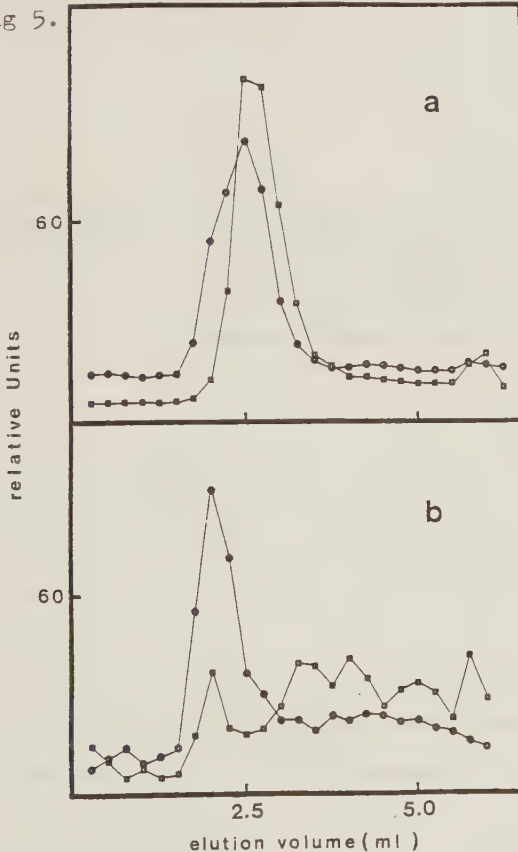


Abb.5 DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Leukozyten
a) aus dem Blut eines Erwachsenen (25 Jahre alt)

b) aus dem eines Föten (28. Schwangerschaftswoche).

—●— Aktivität bei pH 4,0; —■— bei pH 7,0 gemessen

4.2.4. Leber

Die Abbildung 6 zeigt das Elutionsmuster der alpha-Glucosidase aus fötaler Leber (Abb.6b) und aus Erwachsenenleber (Abb.6.a). Die saure alpha-Glucosidase wurde stets in einem Peak eluiert, die neutrale in zwei Peaks.

Abbildung 6.

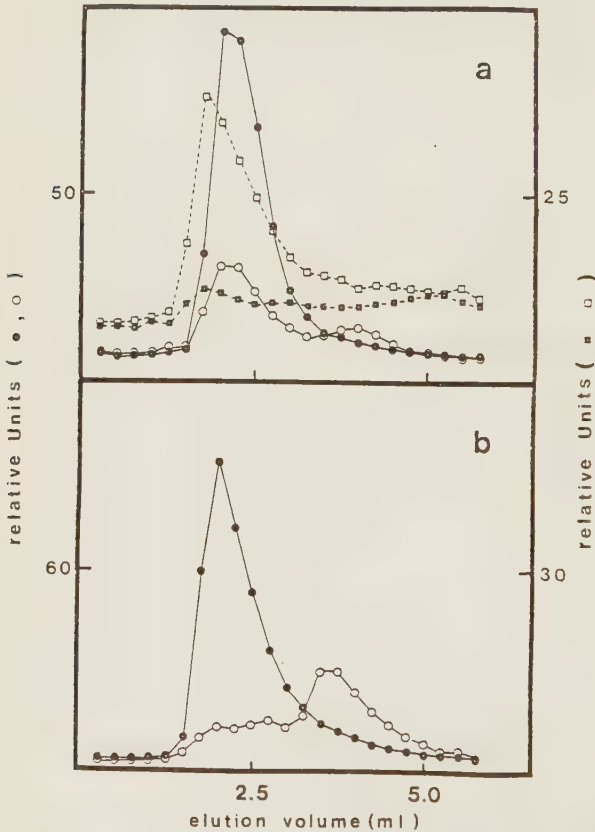


Abb.6.DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Leber
a) eines Erwachsenen (50 Jahre alt);b) fötale Leber
(24. Schwangerschaftswoche);

—●— Enzymaktivität bei pH 4,0 gemessen
—○— Enzymaktivität bei pH 7,0 gemessen

4.2.5. Gehirn, Herzmuskel und Skelettmuskel

Die alpha-Glucosidase Aktivität von fötalem Hirngewebe (Abb.7.a), Herzmuskel (Abb.7.b) und Herzmuskel (Abb.7.c) zeigte säulenchromatographisch ein Elutionsmuster, das dem von Leber entspricht. Im Elutionsprofil von Herzmuskel findet sich zwar nur ein Peak der neutralen alpha-Glucosidase; diese Probe war jedoch besonders lange (7 Monate) bei -20°C aufbewahrt.

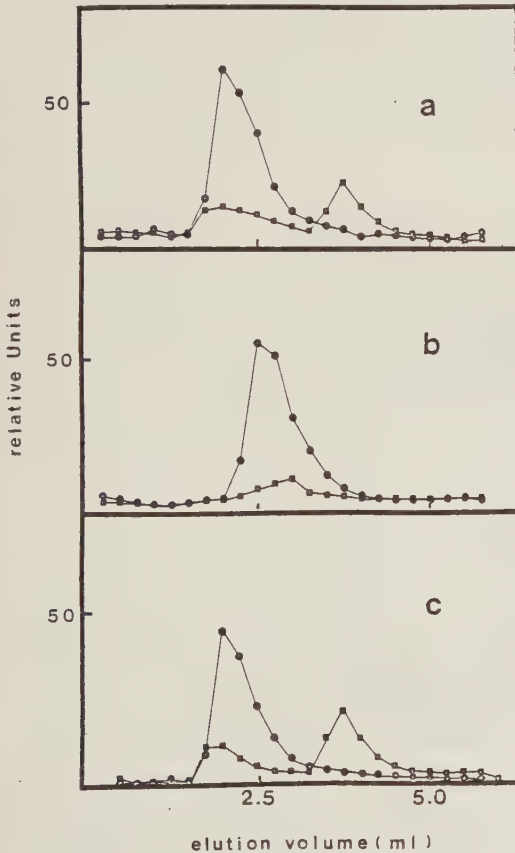


Abb.7.DEAE-Cellulose Säulenchromatographie fötaler Organe:
a)Gehirn; b) Herzmuskel; c) Skelettmuskel

—●— Aktivität bei pH 4,0 —■— bei pH 7,0 gemessen

4.2.6. Niere

Auch in der Niere des Föten und des Erwachsenen erbrachte die Auftrennung einen Peak der sauren alpha-Glucosidase. Die neutrale alpha-Glucosidase hingegen zeigte ein variables Elutionsmuster; gelegentlich wurde sie in zwei Peaks eluiert (Abb.8.b), ähnlich wie Leberenzym; zumeist wurde sie jedoch in mehreren Peaks eluiert, ähnlich wie die neutrale alpha-Glucosidase von fötalen Leukozyten (Abb.8.a).

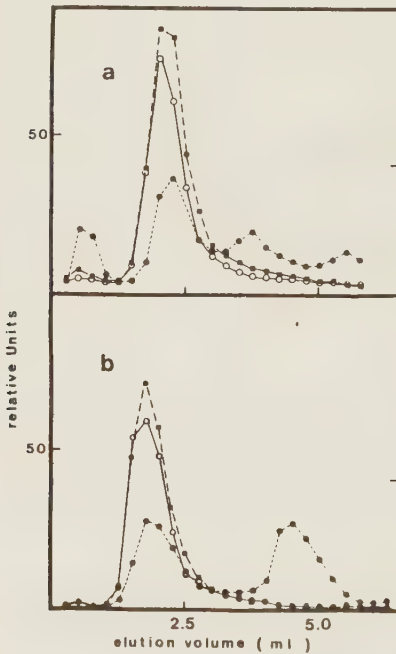


Abb.8.DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Niere
a) eines 19 Wochen alten Föten; b) eines 26 Wochen alten
Föten. Aktivität bei folgenden pH Werten gemessen:
—○— bei pH 4,0; —■— bei pH 5,0; —●— bei pH 7,0.

4.2.7. Fruchtwasser

Mit neun Teilen Wasser verdünntes Fruchtwasser zeigte ein wesentlich anderes Elutionsmuster als Fruchtwasser, welches unverdünnt auf die Säule gegeben wurde.

Verdünntes Fruchtwasser wurde in einem Peak eluiert; die Aktivität der neutralen alpha-Glucosidase in diesem Peak war deutlich höher als die Aktivität des sauren Enzyms im gleichzeitig eluierenden Peak.(Abb.9.c)

Unverdünntes Fruchtwasser wurde in zwei Peaks eluiert. Im früh eluierenden Peak wurde die höchste alpha-Glucosidase-Aktivität bei pH 5,6 gemessen;im spät eluierenden Peak überwog die neutrale Enzymaktivität, während saure alpha-Glucosidase in der entsprechenden Position nur gering meßbar war (Abb.9.b).

4.2.8. Plasma

Auch das Elutionsmuster von Plasmaenzym war unterschiedlich für verdünnt und für unverdünnt aufgetragene Proben. Mit neun Teilen Wasser verdünntes Plasma von Erwachsenen wurde in einem Peak mit saurer alpha-Glucosidase-Aktivität eluiert.Auch neutrale alpha-Glucosidase wurde in einem Peak mit entsprechender Position eluiert,sofern eingefrorene Proben verwandt wurden;nur mit frischen Proben wurde ein zweiter,später eluierender Peak des neutralen Enzyms gefunden (Abb.9.a).

Unverdünntes Plasma zeigte ein ähnliches Elutionsmuster wie unverdünntes Fruchtwasser:Saure und neutrale alpha-Glucosidase-Aktivität in jeweils einem schmalen, früh eluierenden Peak sowie einem breiten,spät eluierenden Peak.Ein Vergleich der sauren mit der neutralen Enzymaktivität zeigte im frühen Peak ein Überwiegen des sauren, im späten Peak ein Überwiegen des neutralen Enzyms.Jedoch war der zweite Peak der neutralen alpha-Glucosidase nicht so breit wie bei unverdünntem Fruchtwasser.

Abbildung 9.

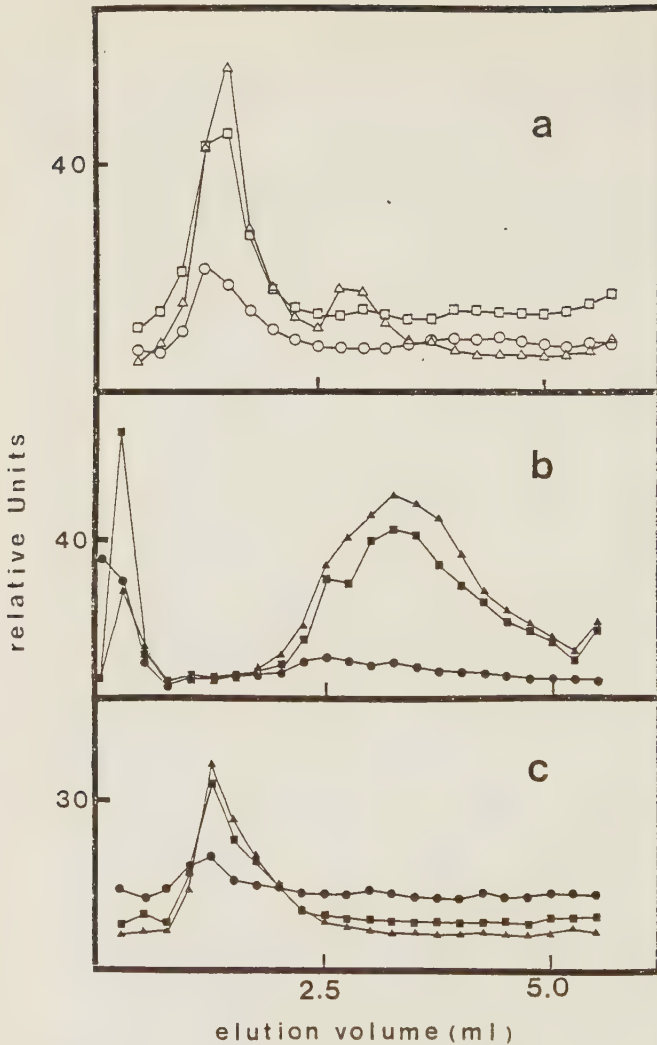


Abb.9 DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Plasma und Fruchtwasser.a) mit neun Teilen Wasser verdünntes Plasma eines Erwachsenen (25 Jahre alt);
b) unverdünntes Fruchtwasser;c)1:10 verdünntes Fruchtwasser

—○— bzw. —●— Aktivität bei pH 4,0 gemessen
—□— bzw. —■— Aktivität bei pH 5,6 gemessen
—△— bzw. —▲— Enzymaktivität bei pH 7,0 gemessen.

4.2.9. Urin

Urin- α -Glucosidase trennte sich stets in zwei Peaks auf, wenn die Enzymaktivität bei pH 4,0, bei pH 5,6 und bei pH 7,0 gemessen wurde. Der jeweils früh eluierende Peak war bei pH 4,0 am höchsten, der jeweils später eluierende Peak war teils bei pH 5,6 und teils bei pH 7,0 am höchsten (Abb.10.a).

Das Größenverhältnis zwischen frühem und spätem Peak war sehr variabel; besonders klein war der frühe Peak (bei allen drei gemessenen pH-Werten) im Urin eines zwei Monate alten Säuglings (Abb.10.b).

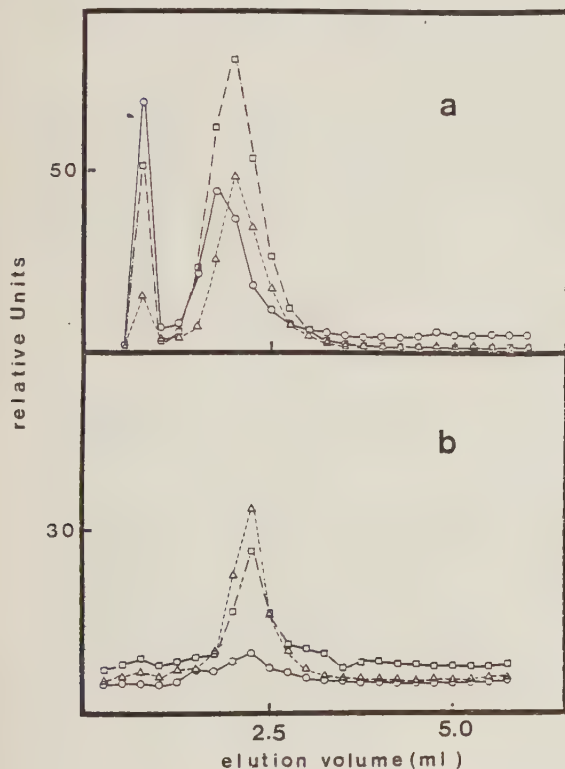


Abb.10 DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Urin
a) eines Erwachsenen(25 jährig);b) eines Säuglings(2 Monate)

—○— Enzymaktivität bei pH 4,0 gemessen;
---□--- bei pH 5,6 ; ---△--- bei pH 7,0 gemessen.

5. Diskussion

Flunarty und Mitarbeiter (14) untersuchten die alpha-Glucosidase Aktivität in Fruchtwasser und in kultivierten Fruchtwasserzellen. Sie fanden, daß KCl keinen Einfluß auf die Aktivität des Fruchtwasserenzym hat, während die lysosomale saure alpha-Glucosidase von kultivierten Fruchtwasserzellen durch Zusatz von KCl gefördert wird. Entsprechende Ergebnisse fanden wir in mehreren Organen; Nierenenzym ließ wie Fruchtwasserenzym bei pH 5,6 gemessen keinen KCl-Einfluß erkennen. Eine Stimulation der sauren alpha-Glucosidase durch NaCl, welche Jeffrey und Mitarbeiter (31) für Rattenleberenzym beschrieben, fanden wir in menschlichen Organen nicht.

Neutrale alpha-Glucosidase Aktivität ist bei Pompe'scher Krankheit nicht vermindert (3). In einigen Organen wurde sogar eine erhöhte Aktivität gefunden; daher wurde ein Quotient aus den Enzymaktivitäten bei pH 4 und bei pH 6,5 zur besseren Abgrenzung von Heterozygoten und von Patienten mit der Erwachsenenform für die Untersuchung von Urin (19 und 23) und von Leukozyten (11) vorgeschlagen. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fujimoto und Mitarbeitern (13) fanden wir, daß dieser Quotient bei der Untersuchung von Hautfibroblasten und Fruchtwasserzellen keinen diagnostischen Wert hat, sondern vielmehr ein Indikator für die Aufbewahrungszeit der Probe bei -20°C ist. Die Aktivität der neutralen alpha-Glucosidase kann auch absichtlich durch Erhitzen bei pH 5 oder durch Ultraschallbehandlung (32) herabgesetzt werden und der Quotient pH 4/pH 6,5 kann dann dazu dienen, eine gewisse Aktivität des neutralen Enzyms bei pH 4 auszuschließen (13). In verschiedenen anderen Organen ist die neutrale alpha-Glucosidase weniger labil; eine bessere Trennung zwischen saurem und neutralem Enzym ist hier durch die geringere Turanosehemmung des neutralen Enzyms möglich. Die von uns gefundene Auftrennung des neutralen Enzyms in zwei

Fraktionen läßt jedoch die Frage offen, ob die genannten Eigenschaften für beide Fraktionen des neutralen Enzyms gelten. Immerhin fanden wir, daß Aufbewahren bei -20°C die später eluierende Fraktion stärker beeinflußt.

Das abweichende Elutionsmuster von neutraler alpha-Glucosidase aus Niere (und aus fötalen Leukozyten) könnte in Zusammenhang stehen mit der Beobachtung, daß Nierenenzym auch bei Pompe'scher Krankheit deutlich meßbare Aktivität bei pH 4 hat, die jedoch durch Turanose nicht gehemmt wird (4,33). Andererseits zeigte die bei pH 4 gemessene Aktivität des Nierenenzyms das gleiche Elutionsmuster wie Leber mit einem Peak in der gleichen Position. Entsprechend fanden Salafsky und Nadler (15) bei der elektrophoretischen Auftrennung von Nierenenzym ebenso wie mit Leberenzym eine Bande mit saurer alpha-Glucosidase Aktivität, welche bei Pompe'scher Krankheit nicht nachweisbar war. Auch die Position dieser Bande war für Nierenenzym und Leberenzym die gleiche. Sie forderten daher die Existenz von mindestens zwei alpha-Glucosidase Formen in der Niere: zum einen eine saure alpha-Glucosidase, die der von Leber entspricht, zum anderen eine Form, die bei Pompe'scher Krankheit persistiert, und die ebenfalls bei pH 4 deutlich meßbare Aktivität hat. Tatsächlich fanden Dreyfus und Alexandre (17) in der Elektrophorese von Nierenenzym neben der "leberentsprechenden" Bande eine zusätzliche Bande mit Enzymaktivität bei pH 4 und pH 6,5, die allerdings nur minimal in Richtung Anode wanderte. Einen entsprechenden zusätzlichen Peak des Nierenenzyms fanden wir mit DEAE-Cellulose Säulenchromatographie weder bei Messung der Enzymaktivität bei pH 4 noch bei pH 5.

Die Elution der sauren alpha-Glucosidase von verschiedenen Organen in einem Peak entspricht den mit Elektrophorese gewonnenen Ergebnissen der meisten anderen Autoren. Ein nur in frischen Extrakten aus gezüchteten Zellen angetroffener zusätzlicher Peak wurde hingegen bisher nicht beschrieben. Möglicherweise wirkt sich hier ein Nachteil aus, den die Elektrophorese gegenüber der Säulenchromatographie hat: Bereits für die Auftrennung wird in der Elektrophorese ein Puffersystem benötigt (zwischen pH 4,3 und pH 6,5), welches dann zur Bestimmung der Enzymaktivität bei einem bestimmten pH-Wert durch ein zweites Puffersystem quasi überspielt werden muß. Die Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose kommt hingegen bei der Auftrennung ohne zusätzliches Puffersystem aus. Über die Signifikanz dieses in frischen Zellen zusätzlichen Peaks lassen sich noch keine sicheren Aussagen machen, da nur wenige Proben untersucht wurden; seine Bedeutung ergibt sich aus der Tatsache, daß zur pränatalen Diagnostik gewöhnlich frische Zellhomogenate herangezogen werden, schon um die Diagnose möglichst früh stellen zu können. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob dieser Peak auch in Fruchtwasserzellen erscheint, welche aus dem Fruchtwasser eines Pompe-kranken Föten entstammen. Bei uns konnte diese Frage bisher nicht beantwortet werden, da keine geeignete Probe zur Verfügung stand.

Die Ähnlichkeit der Elutionsmuster von Fruchtwasser und von Plasma ist eher überraschend, denn Potier und Mitarbeiter (34) fanden bei der Untersuchung von alpha-Glucosidase in zellfreiem Fruchtwasser deutliche Übereinstimmungen dieses Enzyms mit intestinalen Disaccharidasen, denn folgende Eigenschaften zeigten beide Enzyme gemeinsam: pH-Optima zwischen 5,2 und 6,4; höhere Aktivität mit Disaccharid-Substraten als mit künstlichen Substraten; enge Bindung der Enzymaktivität an sedimentierbare Komplexe. Das drastische Verschwinden des Fruchtwasserenzym nach

der 22. Schwangerschaftswoche wurde jedoch auch in Zusammenhang gebracht mit der Theorie, daß Amnion zusammen mit Fruchtwasser in der ersten Schwangerschaftshälfte eine Teilfunktion der Leber übernimmt, nämlich Regulation des Blutglukosespiegels und Glykogenspeicherung (14). Weiterhin könnte auch eine Filtration des Plasmaenzyms in der Niere das Auftreten eines ähnlichen Enzyms in Fruchtwasser erklären, allerdings konnten Shaw und Marriott (35) eine Urinproduktion von fötaler Niere erst in späteren Schwangerschaftsperioden im Fruchtwasser nachweisen.

Die Änderung der Elutionsmuster sowohl von Fruchtwasser- als auch von Plasmaenzym bei der Auftrennung verdünnter Proben läßt eine Änderung der Konformation oder "Subunit"-Struktur vermuten. Gefordert wurde eine dimere Struktur für intestinale alpha-Glucosidase (36) mit möglicher Dissoziation in eine monomere und teilweise Reassoziaton in eine trimere Form aufgrund der beobachteten Sedimentationskonstanten von etwa 13 S, 10 S und 6-7 S. Für die neutrale alpha-Glucosidase in Plazenta (22) wurde ein wesentlich höheres Molekulargewicht (um 320.000) kalkuliert als für das entsprechende saure Enzym (um 103.000).

Entsprechende Untersuchungen über Fruchtwasser- oder Plasmaenzym sind uns nicht bekannt. Einen gewissen Hinweis, daß eine Konformationsänderung bedeutungsvoll sein könnte, geben enzymkinetische Untersuchungen von Jeffrey und Mitarbeitern (31). Für die saure alpha-Glucosidase von Rattenleber forderten sie die Existenz von zwei verschiedenen katalytisch aktiven Zentren (für Disaccharide bzw. Polysaccharide), welche sich gegenseitig beeinflussen können. Auch in Menschenleber wurden in neuester Zeit zwei Unter-einheiten der sauren alpha-Glucosidase mit Molekulargewichten von 88.000 und 76.000 gefunden. Murray und Mitarbeitern (37) gelang diese Auftrennung mit Polyacrylamid-Gel Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat. Darüberhinaus zeigten sie eine bislang unbekannte Heterogenität des sauren Enzyms auf: Chromatographie in Bio Gel P-200 ergab zwei Banden mit unterschiedlichem Kohlenhydrat-Gehalt; isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gel zeigte mehrere Ladungsisomere mit pH Werten zwischen 4,4 und 4,7. Die physiologische Bedeutung dieser Heterogenität bleibt jedoch noch ungeklärt.

Die von uns gefundene Auftrennung von alpha-Glucosidase im Urin in zwei Peaks mag zusammen mit dem Fehlen des früheren, überwiegend saure Enzymaktivität enthaltenden Peaks bei Säuglingen eine Erklärung bieten für Beobachtungen von Salafsky (19) und Soyama (23); sie fanden nämlich bei Erwachsenen im Vergleich zu Kindern eine Verschiebung der pH-Optima zum sauren Bereich hin. Bei Kindern mit Pompe'scher Krankheit im Vergleich zu gesunden Kindern war das pH-Optimum des Urinenzyms hingegen zum neutralen Bereich hin verschoben. Ein Quotient aus den Enzymaktivitäten bei pH 4 und bei pH 6 wurde vorgeschlagen, um die Pompe-Diagnose durch Urinuntersuchung stellen zu können. In unserem Labor wurde eine größere Anzahl von Proben entsprechend untersucht und die Ergebnisse statistisch bearbeitet (38). Dabei wurden die oben genannten Unterschiede zwischen verschiedenen Kollektiven zwar bestätigt, jedoch war die Schwankungsbreite der pH-Kurven so groß, daß eine Diagnosestellung aus dem Urin im Einzelfall nicht möglich schien. Bei der Erwachsenenform der Krankheit konnten Soyama und Mitarbeiter (23) hingegen sogar Homozygote und Heterozygote unterscheiden, indem sie beim Enzymtest KCl zufügten, wodurch nur die Aktivität des sauren Enzyms gefördert wurde. Dabei gingen sie davon aus, daß Urin die gleiche lysosomale saure alpha-Glucosidase enthält wie andere Organe, denn die Auftrennung durch Sephadex G-100 Gelfiltration zeigte keine Abweichung im Elutionsmuster (je ein Peak mit saurer und mit neutraler alpha-Glucosidase). Im Gegensatz dazu fanden wir mit DEAE-Cellulose Säulenchromatographie in der Elution von saurer alpha-Glucosidase deutliche Unterschiede zwischen Urin und anderen Organen.

6. Zusammenfassung

Isoenzyme der sauren alpha-1-4-Glucosidase (E.C.3.2.1.20.) aus verschiedenen menschlichen Organen, Gewebsflüssigkeiten und Zellkulturen sowohl von Erwachsenen als auch von Föten wurden mit Hilfe der DEAE-Cellulose Säulenchromatographie aufgetrennt. Wir benutzten eine speziell kleine Säule und die Enzymaktivität wurde mit Methylumbelliferylglucosid als Substrat und einem sehr empfindlichen Mikroskopfluorimeter gemessen. Diese Methode ermöglichte die Untersuchung von kultivierten Hautfibroblasten und Fruchtwasserzellen.

In den meisten untersuchten Organen wurde die saure alpha-Glucosidase in einem Peak eluiert; die neutrale alpha-Glucosidase hingegen erschien in zwei Peaks. Ein zusätzlicher früh eluierender Peak mit alpha-Glucosidase-Aktivität wurde in frischen Extrakten aus kultivierten Zellen gefunden. Neutrale alpha-Glucosidase besonders von Fibroblasten war sehr empfindlich gegenüber Aufbewahrung bei -20°C .

Die DEAE-Cellulose Säulenchromatographie von Plasma und von zellfreiem Fruchtwasser zeigte starke Ähnlichkeiten im Elutionsmuster der aufgetrennten alpha-Glucosidase. Auftrennung von Urinenzym hingegen erbrachte Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern. Die Organverteilung und weitere Besonderheiten des Enzyms wurden in Proben verschiedenen Ursprungs und Alters untersucht.

Literatur:

- 1 Hers, H.G.:
Alpha glucosidase deficiency in generalized
glycogen-storage disease (Pompe's disease)
Biochem. J. 86, 11-16, 1963
- 2 Hers, H.G.:
Glycogen storage disease, in Advances in metabolic
disease, edited by R. Levine and R. Luft, Vol I, p.1
Academic, New York, 1964
- 3 Lejeune, N., Thinès-Sempoux, D., Hers, H.G.:
Intracellular distribution and properties of
alpha glucosidases in rat liver
Biochem. J. 86, 16-21, 1963
- 4 Steinitz, K., Rutenberg, A.:
Tissue alpha-glucosidase activity and glycogen
content in patients with generalized glycogenosis
Israel J. Med. Sci. 2, 411-421, 1967
- 5 Nitowsky, H.M., Grunfeld, A.:
Lysosomal alpha-glucosidase in type II glycogenosis;
activity in leucocytes and cell cultures in relation
to genotype
J. Lab. Clin. Med. 69, 472-484, 1967
- 6 Williams, H.E.:
Alpha-glucosidase activity in human leucocytes
Biochim. Biophys. Acta 124, 34-38, 1966
- 7 Huijing, F., van Creveld, S., Losekoot, G.:
Diagnosis of generalized glycogen storage
disease (Pompe's disease)
J. Pediatr. 63, 984-987, 1963

- 8 Dancis, J., Hutzler, J., Lynfeld, J., Cox, R.R.:
Absence of acid maltase in glycogenosis type II
(Pompe's disease) in tissue culture
Amer. J. Dis. Child. 177, 108-111, 1969
- 9 Smith, H.L., Amick, L.D., Sidbury, J.B.:
Type II glycogenosis. Report of a case with
four-year survival and absence of acid maltase
associated with an abnormal glycogen
Amer. J. Dis. Child. 111, 475-481, 1966
- 10 Illingworth-Brown, B., Zellweger, H.:
alpha-1-4-glucosidase activity in leucocytes from the
family of two brothers, who lack this enzyme in muscle
Biochem. J. 101, 16-18, 1966
- 11 Koster, J.F., Slee, R.G., Hülsmann, W.C.:
The use of leucocytes as an aid in the diagnosis of a
variant of glycogen storage disease Typ II (Pompe's disease)
Europ. J. Clin. Invest. 2, 467-471, 1972
- 12 Reuser, A.J.J., Koster, J.F., Hoogeveen, A., Galjaard, H.:
Biochemical, immunological and cell genetic studies
in glycogenosis type II
Dissertationsschrift, Veröffentlichung in Vorbereitung
- 13 Fujimoto, A., Fluharty, A.L., Stevens, R.L., Kihara, H.,
Wilson, M.G.:
Two alpha-glucosidases in cultured amniotic fluid
cells and their differentiation in the prenatal
diagnosis of Pompe's disease
Clin. Chim. Acta 68, 177-186, 1976
- 14 Fluharty, A.L., Scott, M.L., Porter, M.T., Kihara, H.,
Wilson, M.G., Towner, J.W.:
Acid alpha glucosidase in amniotic fluid
Biochem. Med. 7, 39-51, 1973

- 15 Salafsky, I.S., Nadler, H.L.:
A fluorometric assay of alpha glucosidase and its
application in the study of Pompe's disease
J. Lab. Clin. Med. 81, 450-454, 1973

- 16 Mekanik, G., Smith, R.L., MacLeod, R.M.:
Enzyme patterns in glycogen storage disease type II
(Pompe's disease)
Metabolism 15, 641, 1966

- 17 Dreyfus, J.C., Alexandre, Y.:
Electrophoretic characterization of acid and neutral
amylase-1,4-glucosidase (acid maltase) in human tissues
and evidence for two electrophoretic variants in
acid maltase deficiency
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 914-920, 1972

- 18 Koster, J.F., Slee, R.G., van der Klei-van Moorsel, J.M.,
Rietra, P.J.G.M., Lucas, C.J.:
Physico-chemical and immunological properties of
acid alpha-glucosidase from various human tissues in
relation to glycogenosis type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 68, 49-58, 1976

- 19 Salafsky, I.S., Nadler, H.L.:
Deficiency of acid alpha-glucosidase in the urine
of patients with Pompe's disease
J. Pediatr. 82, 294-297, 1973

- 20 Koster, J.F., Slee, R.G., Hülsmann, W.C., Niermeijer, M.F.:
The electrophoretic pattern and activities of acid and
neutral maltase of cultivated fibroblasts and amniotic
fluid cells from controls and patients with the variant
of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 40, 294-297, 1972

- 21 Lenard, H.G., Schaub, J., Keutel, J., Osang, M.:
Electromyopathy in type II glycogenosis
Neuropädiatrie 5, 410-424, 1974
- 22 Swallow, D.M., Corney, G., Harris, H.:
Acid alpha-glucosidase: A new polymorphism in
man demonstrable by "affinity" electrophoresis
Ann. Hum. Genet. 38, 391-406, 1975
- 23 Soyama, K., Ono, E., Shimada, N., Tanaka, K., Kusunoki, T.:
Urinary alpha-glucosidase analysis for the detection
of the adult form of Pompe's disease
Clin. Chim. Acta 77, 61-67, 1977
- 24 Franzini, C., Bonini, P.A.:
Alpha glucosidases in human urine
Clin. Chim. Acta 17, 505-510, 1967
- 25 Hug, G., Schubert, W.K., Soukup, S.W.:
Treatment related observations in solid tissues, fibro-
blast cultures and amniotic fluid cells of type II
glycogenosis, Hurler disease and metachromatic leuko-
dystrophy
Birth Defects 9, 160-183, 1973
- 26 Galjaard, H., van Hoogstraaten, J.J., de Josselin de
Jong, J.E., Mulder, M.P.:
Methodology of the quantitative cytochemical analysis
of single or small numbers of cultured cells
Histochem. J. 6, 409-429, 1974
- 27 Koster, J.F., Slee, R.G., Hülsmann, W.C.:
The use of leucocytes as an aid in the diagnosis
of glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 51, 319-325, 1974

- 28 Bakhru-Kishore, R., Desjardins, L., Kelly, S.:
Amicrofluorometric assay of leucocyte alpha-1,4-glucosidase
Clin Chim. Acta 73, 89-92, 1976
- 29 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951
- 30 Wyss, S.R., Koster, J.F., Hülsmann, W.C.:
Choice of leucocyte preparation in the diagnosis of
glycogen storage disease type II (Pompe's disease)
Clin. Chim. Acta 35, 277-280, 1971
- 31 Jeffrey, P.L., Brown, D.H., Illingworth-Brown, B.:
Studies of lysosomal alpha-glucosidase. II. Kinetics
of action of the rat liver enzyme
Biochemistry 6, 1416-1422, 1970
- 32 Butterworth, J., Broadhead, D.M.:
Diagnosis of Pompe's disease in cultured skin fibro-
blasts and primary amniotic fluid cells using 4-methyl-
umbelliferyl-alpha-D-glucopyranoside as substrate
- 33 Salafsky, I.S., Nadler, H.L.:
Alpha-1,4-glucosidase activity in Pompe's disease
J. Pediatr. 79, 794-798, 1971
- 34 Potier, M., Dallaire, L., Melançon, S.B.:
Occurrence and properties of fetal intestinal glycosidases
(disaccharidases) in human amniotic fluid
Biology of the Neonate 27, 141-152, 1975
- 35 Shaw, R.E., Marriott, H.J.:
The origin of amniotic fluid and the bearing on this
problem of foetal urethral atresia
J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. 56, 1004-1009, 1949

- 36 Eggermont, E., Hers, H.G.:
The sedimentation properties of the intestinal
alpha-glucosidases of normal subjects and of
patients with sucrose intolerance
Eur. J. Biochem. 9, 488-496, 1969
- 37 Murray, A.K., Brown, B.I., Brown, D.H.:
The molecular heterogeneity of purified human liver
lysosomal alpha-glucosidase (acid alpha-glucosidase)
Arch. Biochem. Biophys. 185, 511-524, 1978
- 38 Bayerl-Förster, A.:
Untersuchung der Aktivitäten verschiedener alpha-
Glucosidasen im Urin von Patienten mit einer
Glycogenose Typ II (Morbus Pompe)
Dissertationsschrift
Universität München 1976

Lebenslauf

Geboren wurde ich, Michael Drefers, am 29.5.1951 in Schwerin in Mecklenburg. 1953 übersiedelte unsere fünfköpfige Familie in die Bundesrepublik; in Lage in Lippe war mein Vater von 1956 bis 1974 als praktischer Arzt tätig. In Lage besuchte ich vier Jahre lang die Grundschule, anschließend acht Jahre lang das altsprachliche Gymnasium in Detmold. Von 1969 bis 1972 studierte ich Chemie an der Ludwig Maximilians-Universität in München. Nach meiner Zulassung zum Medizinstudium studierte ich bis zum Physikum an der Universität München, anschließend an der Technischen Universität München, insgesamt zwölf Semester. Am 15.11.1978 erhielt ich nach bestandener ärztlicher Prüfung die Approbation als Arzt. Ab Januar 1979 beginne ich meine Facharztausbildung in Innerer Medizin bei der versorgungsärztlichen Untersuchungsstelle in München, Martiusstraße 4.

